

## 活動性肺結核患者の末梢血単球の IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ および IL-6 産生能と栄養障害との相互関連性の検討

奈良県立医科大学第2内科学教室

塚 口 勝 彦

### A STUDY OF INTERACTION BETWEEN INTERLEUKIN-1 $\beta$ , TUMOR NECROSIS FACTOR $\alpha$ , AND INTERLEUKIN-6 PRODUCTION BY PERIPHERAL BLOOD MONOCYTES AND NUTRITIONAL DISTURBANCE IN ACTIVE PULMONARY TUBERCULOSIS

KATSUHIKO TSUKAGUCHI

*The Second Department of Internal Medicine, Nara Medical University*

Received September 29, 1992

**Summary:** Nutritional disturbance has been empirically observed in patients with pulmonary tuberculosis. We have already demonstrated that malnutrition is frequent in these patients by scientific nutritional assessment, although the mechanism of this nutritional disturbance remains unclear. To elucidate this mechanism, I measured the production of interleukin-1  $\beta$  (IL-1  $\beta$ ), tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ), and interleukin-6 (IL-6) by peripheral blood monocytes, and correlated them with nutritional parameters in those patients. Supernatants of monocyte cultures after 24 hours stimulation by lipopolysaccharide were analysed by enzyme linked immunosorbent assay for IL-1  $\beta$ , TNF  $\alpha$ , and IL-6. In order to assess nutritional status I measured some visceral proteins (serum albumin, transferrin, prealbumin, retinol binding protein), plasma amino acids, and anthropometrics. The results are as follows.

(1) Patients with pulmonary tuberculosis were confirmed to be malnourished in visceral proteins, plasma amino acids, and anthropometric indices.

(2) In patients with moderate and mild nutritional depletion the production of IL-1  $\beta$ , TNF  $\alpha$ , and IL-6 was significantly higher than in healthy controls, and correlated inversely with the nutritional parameters.

(3) In patients with severe nutritional depletion the production of these cytokines was significantly lower than in healthy controls.

The present study suggested an interaction between nutritional status and these cytokines: the hypermetabolic effects of IL-1  $\beta$ , TNF  $\alpha$ , and IL-6 might induce nutritional disturbance in patients with pulmonary tuberculosis, and severe nutritional disturbance might in turn diminish the production of these cytokines.

#### Index Terms

pulmonary tuberculosis, interleukin-1  $\beta$ , tumor necrosis factor  $\alpha$ , interleukin-6, nutrition

## 緒 言

肺結核患者に“やせ”の患者が多いことは以前から経験的に知られていたが、高頻度に栄養障害の存在することが栄養学的指標による客観的評価で近年にいたり証明された<sup>1)</sup>。一方、結核免疫における細胞性免疫の重要性は諸家の認めるところで<sup>2,3)</sup>、肺結核患者に細胞性免疫能低下が存在し、この低下が結核発病、進展の原因となりうること、更に、細胞性免疫能が患者の栄養状態と密接に関係していることが報告されてきた<sup>4)</sup>。

近年、様々なサイトカインが同定され、免疫反応の key mediator とみなされているが、結核免疫においても多くのサイトカインの関与が知られている<sup>5)</sup>。その中でも特に結核免疫に関係の深いサイトカインは Interleukin-1(IL-1)、Tumor necrosis factor(TNF)、Interleukin-6(IL-6)で、エフェクターマクロファージ機能に影響を与え抗菌作用等を担っているとする報告もあるが、十分に解明されていない<sup>6)</sup>。

また、これらは炎症と代謝反応との調節を司る中心的なサイトカインで、蛋白、脂質代謝を介して栄養状態にも大きな影響を与えている<sup>7)</sup>。

今回、これらの結核抗菌免疫を担う3種類のサイトカインが慢性炎症状態にある肺結核患者の“やせ”(栄養障害)にも関与している可能性を患者の栄養評価と末梢血単球のサイトカイン産生能とを測定することにより検討し新しい知見を得たので報告する。

## 対 象

対象は明かな合併症がなく、喀痰中結核菌の排菌が確認された未治療の活動性肺結核患者30例(男性21例、女性9例、平均年齢 $42.6 \pm 16.2$ (mean $\pm$ SD)歳)と対照として年齢、性、喫煙習慣を合致させた健康人について検討した。

## 方 法

### 1. IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6 産生能の測定

#### 1) 末梢血単球の分離

患者と健康人静脈血をヘパリン化採血、同量のリン酸緩衝生理食塩水(PBS)を加え混和、Ficoll-hypaque 比重遠心法(400 g, 30 分間)にて単核球画分採取、PBS で3回洗浄後 10 % fetal calf serum(FCS)(Sigma chemical Co. St. Louis, MO, USA)加 RPMI1640 培養液(GIBCO LABORATORIES, New York, USA)に浮遊、あらかじめ FCS にてコーティングしたプラスチックベトリディッシュ(25020 CORNING Laboratory Sciences Com-

pany, New York, USA)に添加し 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>下で 1 時間孵置した。孵置後上清を除き PBS にて 3 回洗浄、非附着細胞を除去した。0.2 % EDTA, 5 % FCS 加 PBS を 5 ml 加え 4°C, 15 分間孵置、ピペッティング操作にて附着細胞を回収し、10 % FCS 加 RPMI1640 培養液で  $5 \times 10^5$ /ml に調整した。なお、回収細胞の 97 % 以上がペルオキシダーゼ染色陽性であった。

#### 2) 培養上清の回収

$5 \times 10^5$ /ml に調整した単球浮遊液 100  $\mu$ l を 96 穴平底プレート(24860 CORNING)に分注、10  $\mu$ g/ml(最終濃度)の Lipopolysaccharide(LPS, W. E. Coli 0127: B8 DIFCO LABORATORIES Detroit, MI, USA)を添加し 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>下で 24 時間培養後上清を回収、測定まで -80°C で保存した。この上清中に含まれる IL-1 $\beta$ , TNF  $\alpha$ , IL-6 活性を単球のそれぞれの産生能とした。

#### 3) IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6 活性の測定

##### (1) IL-1 $\beta$ 活性の測定

IL-1 $\beta$  の測定は、enzyme linked immunosorbent assay(ELISA)法によったが<sup>8-10)</sup>、IL-1 $\beta$  に対するモノクローナル抗体(CISTRON BIOTECHNOLOGY, Pine Brook, NJ, USA)をプレートに固定、サンプル、スタンダードを 100  $\mu$ l ずつ注入、37°C, 2 時間孵置、IL-1 $\beta$  に対するウサギ抗血清(2 次抗体)を添加、更に 37°C, 2 時間孵置後 horseradish peroxidase 標識抗ウサギ IgG(3 次抗体)を添加、室温で静置後基質(o-phenylenediamine, OPD)を添加し、発色を比色計にて測定、標準曲線から IL-1 $\beta$  活性を算定した。

##### (2) TNF $\alpha$ 活性の測定

TNF  $\alpha$  活性測定も ELISA 法によったが、TNF  $\alpha$  に対するモノクローナル抗体(ENDOGEN INF. Boston, MA, USA)をプレートに固定、サンプル、スタンダードを注入後 37°C, 2 時間孵置、TNF  $\alpha$  に対するウサギ抗血清(2 次抗体)を添加、37°C, 1 時間孵置、alkaliphosphatase 標識抗ウサギ IgG(3 次抗体)を添加、37°C, 1 時間孵置後基質(p-nitrophenylphosphate)を添加、発色を比色計にて測定した。

##### (3) IL-6 活性の測定

IL-6 活性測定も ELISA 法によったが、サンプル、スタンダードを抗 IL-6 モノクローナル抗体(Genzyme Corporation Boston, MA, USA)で固相化したプレートに添加、室温で 2 時間孵置、biotin を結合した 2 次抗体を添加し、更に室温で 1 時間孵置、streptoavidin-horseradish peroxidase 複合体を添加、発色を比色計にて測定した。

### 2. 栄養評価の指標

1) 身体計測(Anthropometric measurements)

(1) 身長・体重比(% ideal body weight, % IBW)

同一身長標準体重に対する体重比で、標準体重は松木<sup>11)</sup>の標準体重表を用いた。

(2) 上腕三頭筋部皮下脂肪厚(triceps skin fold thickness, TSF)

利き腕と反対側の肘中点背側(Fig. 1-A)の三頭筋部における皮厚を Harpenden skinfold calipers を用いて合計3回計測し(Fig. 1-C), その平均値をとったが、これは脂肪量の指標とされている。

(3) 上腕囲(arm circumference, AC)

利き腕と反対側の肘中点で巻尺を用いて測定した(Fig. 1-B)。

(4) 上腕筋囲(arm muscle circumference, AMC)

TSF と AC から次の式を用いて算出したが

$$AMC_{(cm)} = AC_{(cm)} - 3.14 \times TSF_{(cm)}$$

これは筋肉量の指標とされている。ただし TSF, AMC は金ら<sup>12)</sup>の標準値に対する比率, すなわち, %TSF, %AMC で表した。

2) 血液生化学的検査

(1) 内臓蛋白(visceral protein)

①血清アルブミン(albumin, Alb)

BCG(bromocresol green)法で測定した。

② Rapid turnover protein

a)血清トランスフェリン(transferrin, Tf)

b)血清プレアルブミン(prealbumin, PreAlb)

c)血清レチノール結合蛋白(retinol binding protein,

RBP)

いずれも Partigen plate(HOECHST JAPAN, Tokyo, JAPAN)を用いた一元免疫拡散法で測定した。

(2)血漿遊離アミノ酸分析

血漿1 ml に2%スルホサリチル酸水溶液を等量加え15分間振蕩攪拌後, 1100 g で15分間遠沈, 上清を0.5 N の HCl で pH 2.2 に調整し, これをサンプルとして日立835型アミノ酸自動分析計で測定した。

a)分枝鎖アミノ酸(branched chain amino acids, BCAA)valine+leucine+isoleucine

b)芳香族アミノ酸(aromatic amino acids, AAA)tyrosine+phenylalanine

c)BCAA/AAA=Fischer ratio

この研究における統計学的平均値の有意差検定には Student's t-test, パラメータ間の相関は相関係数を算出した。

## 成 績

### 1. 活動性肺結核患者の栄養評価

#### (1) 生化学的指標

血清アルブミン値は対照群  $4.42 \pm 0.52$  g/dl, 患者群  $3.45 \pm 0.66$  g/dl, トランスフェリンは対照群  $309 \pm 31.5$  mg/dl, 患者群  $227 \pm 50.9$  mg/dl, プレアルブミンは対照群  $35.1 \pm 6.23$  mg/dl, 患者群  $21.8 \pm 10.2$  mg/dl, レチノール結合蛋白は対照群  $4.08 \pm 1.15$  mg/dl, 患者群  $2.50 \pm 1.56$  mg/dl, Fischer ratio は対照群  $3.55 \pm 0.37$ , 患者群  $2.81 \pm 0.69$  といずれも患者群で有意に低値を示

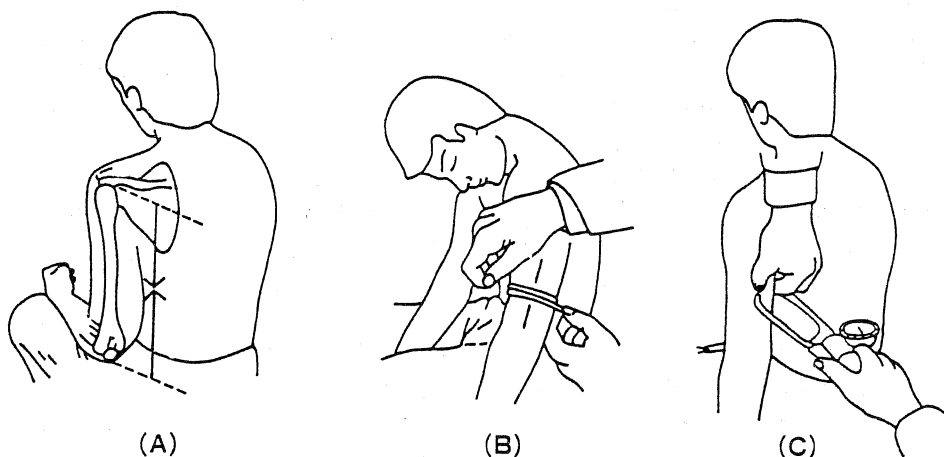


Fig. 1. Techniques for anthropometric measurements.

A : the site of the measurements (the midpoint of the arm between the acromial process of the scapula and the olecranon process of the elbow) B : arm circumference (AC) C : triceps skin fold thickness (TSF)

した( $p<0.01$ ) (Table 1).

## (2) 身体計測

%IBWは対照群  $101 \pm 10.2$ , 患者群  $85.5 \pm 14.8$ , %AMCは対照群  $99.5 \pm 7.90$ , 患者群  $82.0 \pm 11.5$ , %TSFは対照群  $106.2 \pm 46.3$ , 患者群  $73.4 \pm 20.4$  といずれも患者群で有意に低値を示した( $p<0.01$ ) (Table 2).

Blackburn や Bistrian ら<sup>13-15)</sup>は栄養指標の値で栄養障害の程度を(1)高度(健常人の60%以下), (2)中等度(60~80%), (3)軽度(80~90%)の3群に分類した. 今回の検討では肺結核患者の生化学的栄養指標はいずれも対照群の平均の60~80%と中等度の栄養障害を示し, 身体計測値は%IBW, %AMCは軽度, %TSFは中等度の範囲で%TSFが最も低値を示した.

## 2. 活動性肺結核患者のサイトカイン産生能

IL-1 $\beta$ 産生能は対照群  $5.51 \pm 1.31$  ng/ml, 患者群  $7.27 \pm 2.89$  ng/ml, TNF $\alpha$ 産生能は対照群  $1.44 \pm 0.39$  ng/ml, 患者群  $3.21 \pm 1.91$  ng/ml, IL-6産生能は対照群  $14.5 \pm 2.50$  ng/ml, 患者群  $20.1 \pm 7.59$  ng/ml といずれも患者群で有意の高値を示した( $p<0.01$ ) (Table 3).

## 3. 栄養学的指標とサイトカイン産生能との相関

まず患者群全体で内臓蛋白の血清アルブミン値とIL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6産生能間の関係を検討した. 血清アルブミン値が $2.6 \sim 3.6$  g/dl(これは健常人の60%~80%に相当する)の中等度栄養障害の存在する患者群のIL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6産生能が最も高値を示した. アルブミン値が $2.6$  g/dl以下の高度栄養障害群,  $3.6$  g/dl以上の軽度栄養障害群および栄養障害の存在しない群ではサイトカイン産生能は低値であった(Fig. 2). 同様の傾向は身体計測値の%TSFとIL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6産生能間にも認められた(Fig. 3). 前述のBlackburnらの分類<sup>13-15)</sup>から健常人の60%以下の栄養状態である高度栄養障害の存在する肺結核患者は重症で予後も不良のことが多いので<sup>16)</sup>, 患者群の栄養障害の程度を血清アルブミン値で高度栄養障害群( $\text{Alb} \leq 2.6$ ) (a群), 中等度から軽度栄養障害群および栄養障害の存在しない群(以下, 中等度以下栄養障害群)( $\text{Alb} > 2.6$ ) (b群)の2群に分け各患者群でのIL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6産生能を検討した(Fig. 4). IL-1 $\beta$ 産生能はa群  $3.74 \pm 1.19$  ng/mlで対照群  $5.51 \pm 1.31$  ng/mlに比し有意の低値( $p<0.01$ ), b群  $8.01 \pm 2.58$  ng/mlで対照群に比し有意の高値を示した( $p<0.01$ ). TNF $\alpha$ 産生能はa群  $0.93 \pm 0.68$  ng/ml, b群  $3.67 \pm 1.75$  ng/mlでa群は対照群  $1.44 \pm 0.39$  ng/mlより有意に低値( $p<0.05$ ), b群は対照群より有意に高値を示した( $p<0.01$ ). IL-6産生能もa群  $11.2 \pm$

Table 1. Biochemical nutritional assessment in patients and healthy controls

Nutritional parameters	Patients(N=30)	Controls(N=30)
Alb (g/dl)	$3.45 \pm 0.66^*$	$4.42 \pm 0.52$
Tf (mg/dl)	$227 \pm 50.9^*$	$309 \pm 31.5$
PreAlb (mg/dl)	$21.8 \pm 10.2^*$	$35.1 \pm 6.23$
RBP (mg/dl)	$2.50 \pm 1.56^*$	$4.08 \pm 1.15$
Fischer ratio	$2.81 \pm 0.69^*$	$3.55 \pm 0.37$

Each value represents the mean  $\pm$  SE (\* $p<0.01$  from controls)

Table 2. Anthropometric measurement in patients and healthy controls

Anthropometrics	Patients(N=30)	Controls(N=30)
%IBW	$85.5 \pm 14.8^*$	$101 \pm 10.2$
%AMC	$82.0 \pm 11.5^*$	$99.5 \pm 7.90$
%TSF	$73.4 \pm 20.4^*$	$106.2 \pm 46.3$

Each value represents the mean  $\pm$  SE (\* $p<0.01$  from controls)

Table 3. Production of cytokines in patients and healthy controls

Cytokines	Patients(N=30)	Controls(N=30)
(1)IL-1 $\beta$ (ng/ml)	$7.27 \pm 2.89^*$	$5.51 \pm 1.31$
(2)TNF $\alpha$ (ng/ml)	$3.21 \pm 1.91^*$	$1.44 \pm 0.39$
(3)IL-6 (ng/ml)	$20.1 \pm 7.59^*$	$14.5 \pm 2.50$

Each value represents the mean  $\pm$  SE (\* $p<0.01$  from controls)

$1.80$  ng/ml, b群  $22.2 \pm 6.63$  ng/mlで同様に対照群  $14.5 \pm 2.50$  ng/mlよりa群で有意に低値, b群で有意に高値を示した( $p<0.01$ ).

次に中等度以下栄養障害患者群における栄養障害の程度とIL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6産生能との関係を検討した.

1) 生化学的栄養指標による栄養障害の程度とサイトカイン産生能との関係

### (1) IL-1 $\beta$ 産生能

Alb, Tf, PreAlb, Fischer ratio間有意の負の相関を認めた( $p<0.01$ ) (Fig. 5).

### (2) TNF $\alpha$ 産生能

IL-1 $\beta$ の検討と同様に4種の栄養指標と有意の負の相関を認めた( $p<0.01$ ) (Fig. 6).

### (3) IL-6産生能

同様4種の栄養指標と有意の負の相関を認めた( $p<0.01$ ) (Fig. 7).

IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6産生能のいずれもRBPとは同様の傾向は存在するが有意ではなかった.

2) 身体計測値による栄養障害の程度とサイトカイン

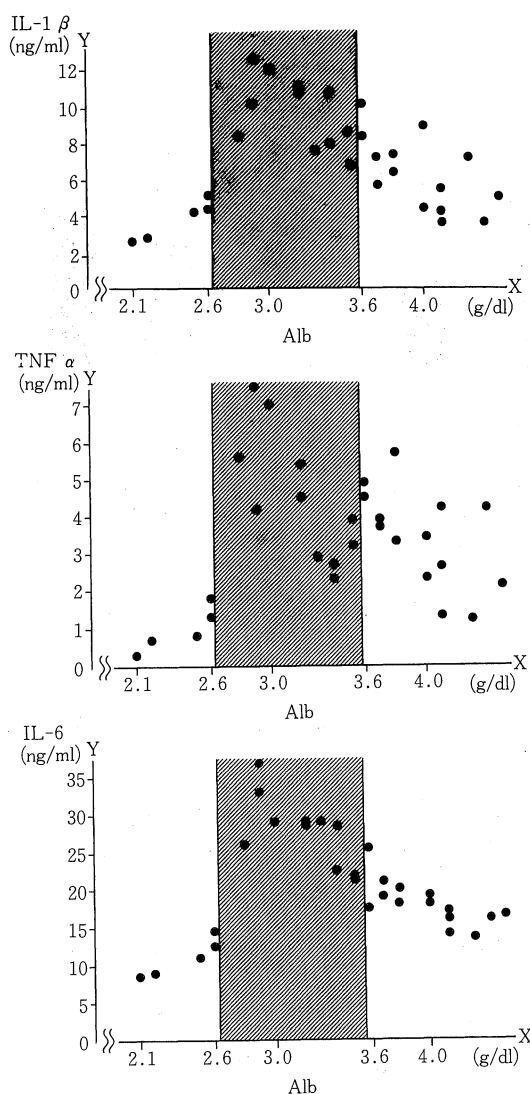


Fig. 2. Correlation between serum Alb and cytokine productions in patients with pulmonary tuberculosis.

#### 産生能との関係

##### (1) IL-1 $\beta$ 産生能

%IBW, %AMC, %TSFのすべての身体計測値と有意の負の相関を認めた( $p < 0.01$ )(Fig. 8).

##### (2) TNF $\alpha$ 産生能

すべての身体計測値と有意の負の相関を認めた( $p < 0.01$ )(Fig. 9).

##### (3) IL-6産生能

すべての身体計測値と有意の負の相関を認めた( $p < 0.01$ )(Fig. 10).

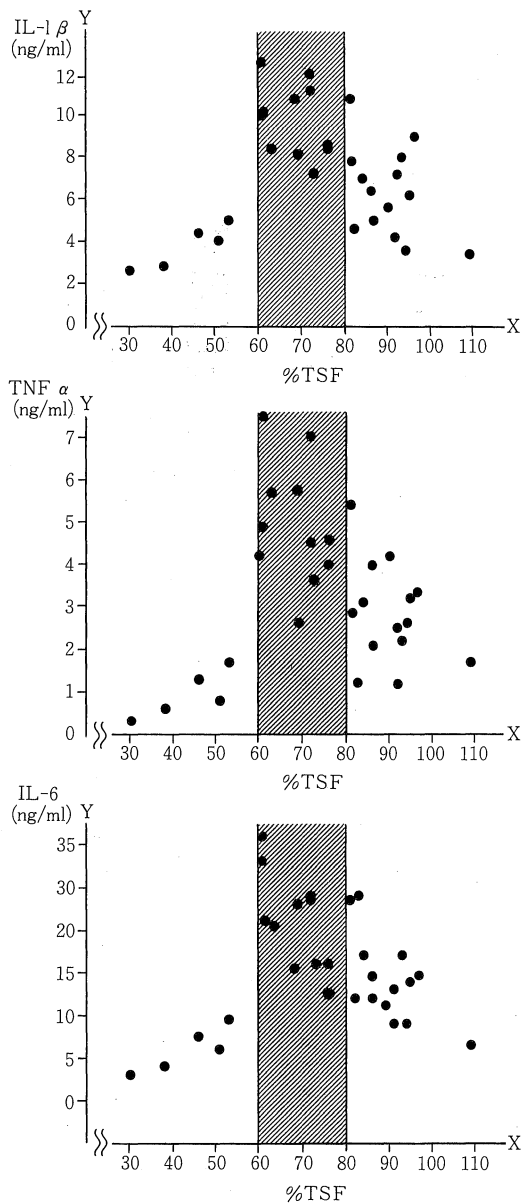


Fig. 3. Correlation between %TSF and cytokine productions in patients with pulmonary tuberculosis.

高度栄養障害群ではこれらのサイトカイン産生能と生化学的栄養指標、身体計測値間には有意な相関は認めなかった。

#### 考 察

肺結核患者でやせた患者が多く、“やせ”が結核発病に関与し、栄養補給が病状の改善に有効であることは以前

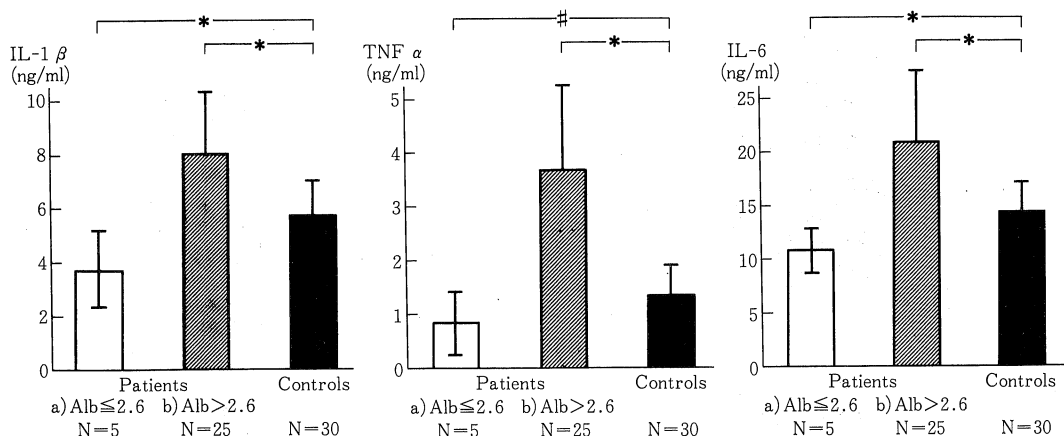


Fig. 4. Comparison of cytokine production classified by the grade of nutritional depletion, cytokine production in patients with serum albumin  $\leq 2.6$ ; □, serum albumin  $> 2.6$ ; ▨, and in healthy controls; ■. Each value represents the mean  $\pm$  SE. Student's t test \* $p < 0.01$ , # $p < 0.05$  from controls

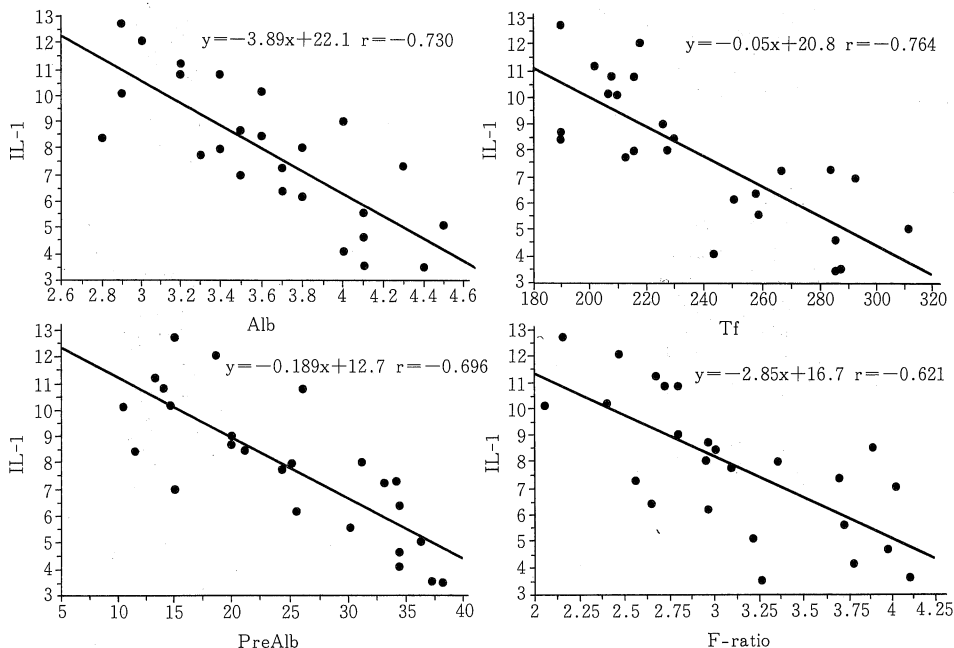


Fig. 5. Correlation between biochemical parameters and IL-1β production in patients with normal nutritional status and with mild or moderate nutritional depletion.

から経験的によく知られていたが、栄養障害と結核との関連が客観的に検討されたのは最近のことであった。肥満度と発病率とは負の相関を示す<sup>17,18)</sup>，“やせ”が栄養摂取量、バランスも含め食事不規則者に多く、既感染結核の発病要因になっている<sup>19)</sup>などの栄養障害と結核発病との因果関係とを探索する臨床的検討から、当科の前川<sup>1)</sup>、吉川<sup>4)</sup>による詳細な栄養評価に基づく結核発病後の栄養障

害の証明につながった。

今回の著者の検討でも患者群では生化学的栄養指標値、身体計測値のすべてが対照群に比し有意の低値を示し、肺結核患者で栄養障害の存在する割合が高値を占めることが証明された。栄養障害の程度に関してはすべての生化学的指標と身体計測値の%TSFとが健常群平均の60~80%でBlackburnら<sup>13-15)</sup>による中等度に相当

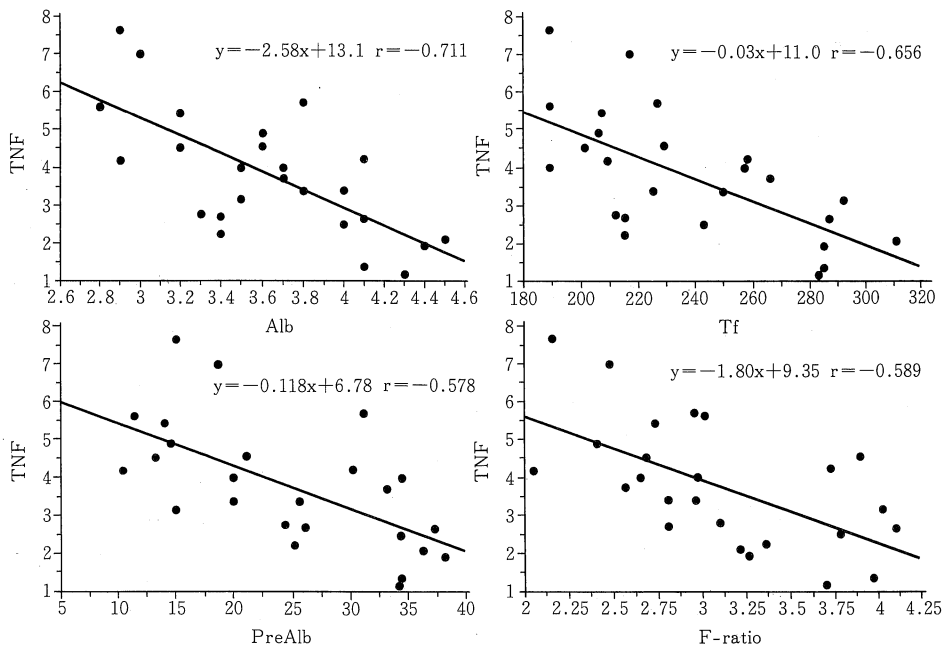


Fig. 6. Correlation between biochemical parameters and TNF  $\alpha$  production in patients with normal nutritional status and with mild or moderate nutritional depletion.

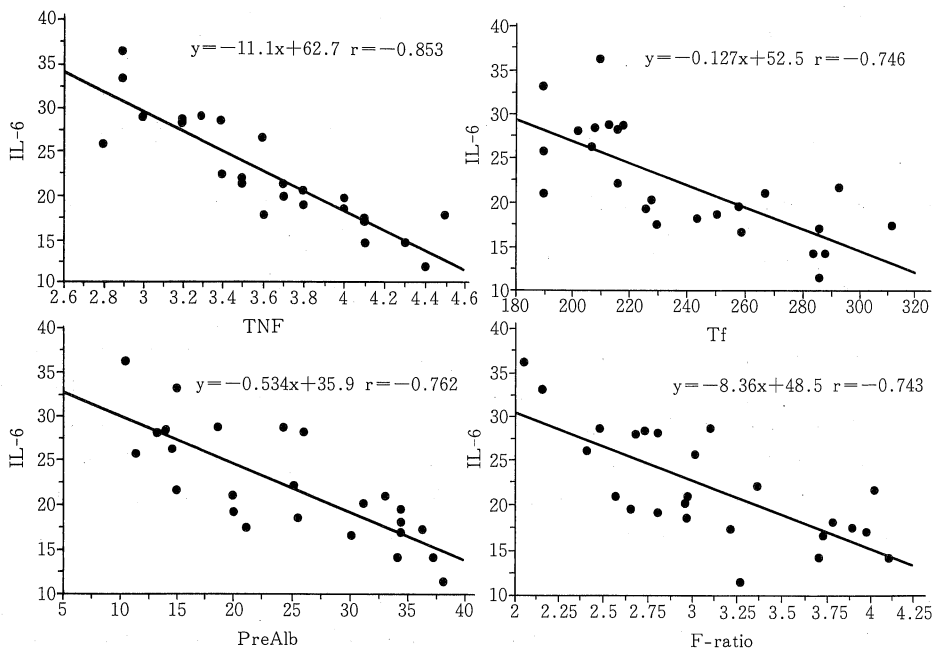


Fig. 7. Correlation between biochemical parameters and IL-6 production in patients with normal nutritional status and with mild or moderate nutritional depletion.

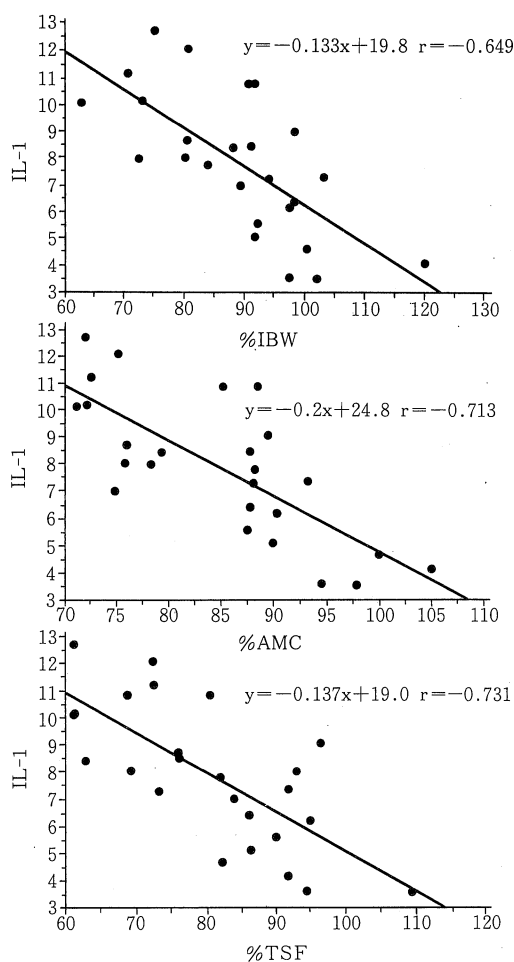


Fig. 8. Correlation between anthropometrics and IL-1 $\beta$  production in patients with normal nutritional status and with mild or moderate nutritional depletion.

し, %IBW, %AMC は 80 % 以上の軽度に対応した。これらの結果は吉川<sup>4)</sup>の報告と一致し, 肺結核患者の栄養障害は中等度～軽度のものが多く, 体脂肪(fat mass)を表す TSF がより低下していることは貯蔵脂肪の消費がまず生じ, その後 AMC, IBW で表される lean body mass の減少につながっていく可能性を示した。

血漿遊離アミノ酸分析は当初 protein calory malnutrition (PCM) の患者で行われ, これらの患者では必須アミノ酸, 非必須アミノ酸のインバランスの存在が指摘されている<sup>20)</sup>。その後 Fischer<sup>21, 22)</sup>が肝不全患者では分枝鎖アミノ酸 (BCAA) が減少, 芳香族アミノ酸 (AAA) が増加し, その比 (Fischer ratio) がアミノ酸インバランスの指標となり, 肝不全の程度, 予後の判定に使

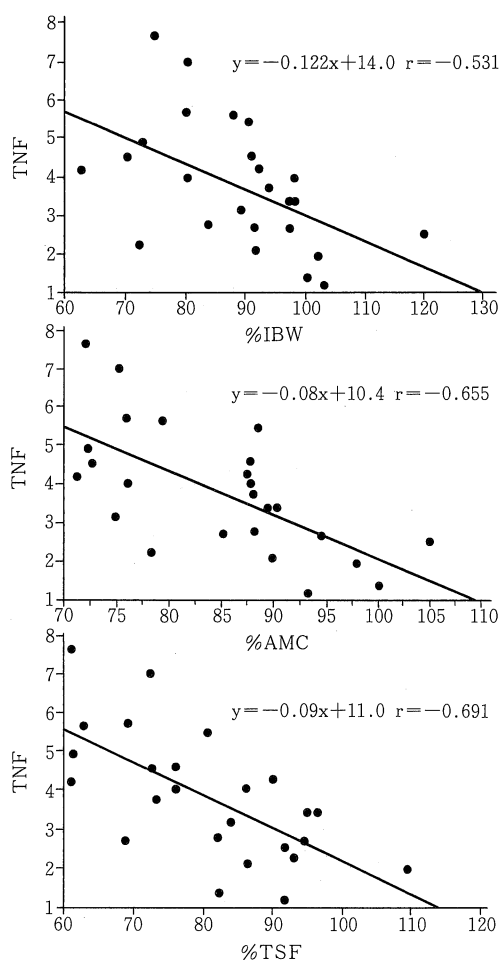


Fig. 9. Correlation between anthropometrics and TNF $\alpha$  production in patients with normal nutritional status and with mild or moderate nutritional depletion.

用しうることを報告している。更に栄養状態との関連では武藤<sup>23)</sup>が Fischer ratio の低下が栄養障害の程度を表すことを示し, Fischer ratio が栄養指標として有用であると述べている。肺結核患者の栄養状態との関連では吉川<sup>4)</sup>が詳細な検討を行い, BCAA は対照群の 91 % と減少, AAA は 120 % と増加, Fischer ratio は 79 % と低下していることを示し, 肺結核患者での栄養障害の存在をアミノ酸分析の面からも証明している。

外傷や敗血症などの侵襲時に食物摂取量は低下しているにもかかわらず窒素排泄量は減少せず, N バランスが負になることはよく観察されることである。これは体内での異化作用の亢進を示し, 実際に筋肉や脂肪が分解, 生成したアミノ酸や脂肪酸がエネルギー源として利用さ



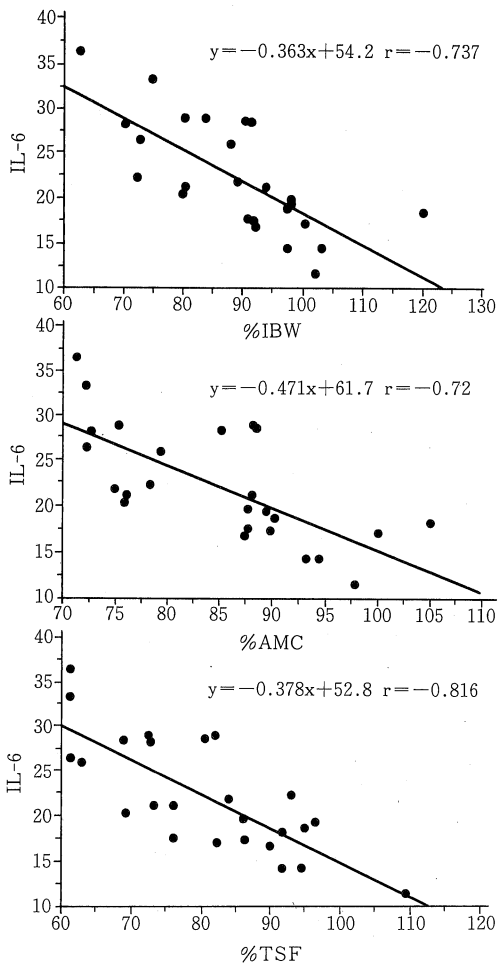


Fig. 10. Correlation between anthropometrics and IL-6 production in patients with normal nutritional status and with mild or moderate nutritional depletion.

れている<sup>24-26)</sup>。このようなストレスによる筋蛋白分解時に生じるアミノ酸の中で、分枝鎖アミノ酸(BCAA)はその量が多いこと、また産生エネルギー量の割合が大きいことなどから優先的に分解され、エネルギー源として利用されるほか、アミノ基転移をうけ alanine, glutamine などの糖原性アミノ酸として肝に輸送され糖新生に利用される。一方、芳香族アミノ酸(AAA)は末梢で利用されないためこのような筋肉分解時には増加する。したがって BCAA の減少、AAA の増加、すなわち Fischer ratio の低下は栄養障害、その中でも筋蛋白分解による異化亢進の程度を表す指標となり得る<sup>27-29)</sup>。今回の検討でも患者群の Fischer ratio をはじめ生化学的栄養指標、身体計測値の低下を認めたことは結核という慢性感染性におい

ても異化亢進が栄養障害の一因となっていることを示唆していると考えられる。

近年、多くのサイトカインが同定されてきたが、これらのサイトカインは免疫反応の調節を担っており、その機能は非常に多彩である。その中でも IL-1 $\beta$ , TNF  $\alpha$ , IL-6 は multifunctional cytokine の代表的なものである。IL-1 は T 細胞, B 細胞, 単球などの免疫系細胞, 線維芽細胞, 骨, 筋細胞などの結合組織系細胞, 視床下部, 脳下垂体などの中枢神経系細胞, 肝, 腎細胞など非常に多種の細胞を標的細胞として作用し, IL-2 をはじめ他のサイトカインの誘導, T, B 細胞の活性化, 増殖, 多核白血球の chemotaxis の誘導, 線維芽細胞からのコラゲナーゼ誘導, 筋肉分解, 発熱, ACTH の分泌促進, 急性期反応蛋白の誘導, メサンギウム細胞の増殖などまさに multifunctional cytokine の名どおりの多彩な機能を持っている<sup>30-32)</sup>。TNF は当初は移植腫瘍に出血性壊死を惹起させる物質として発見され<sup>33)</sup>, cancer cachexia を引き起こすカケクチンと同一物質であることが判明している<sup>34)</sup>。TNF  $\alpha$  も IL-1 と同様に多様な機能を持っており, IL-1 の作用と重複する点が多いが<sup>35)</sup>, 脂肪細胞に対する影響はより大きい<sup>36)</sup>。IL-6 も同様に多種多彩な標的細胞と機能とを有するが, 多数の急性期反応蛋白合成にあずかるなど, 代謝面への影響も大きい<sup>37)</sup>。

これらのサイトカインは感染防御機構においても重要な機能を果たしていると考えられる。動物実験でのクレブシエラヤリステリアに対する IL-1, TNF  $\alpha$  の防御作用<sup>6,38)</sup>, 髄膜炎における髄液中の IL-6 の上昇<sup>39)</sup>など多くの報告がある。また, 慢性感染症の一つである結核の免疫においても検討が加えられ, IL-1, TNF  $\alpha$  は結核病巣を局限化する肉芽腫形成に関与するとされ<sup>40-42)</sup>, また TNF  $\alpha$  は他のサイトカインと<sup>5,43,44)</sup>あるいは活性型ビタミン D と<sup>45)</sup>協調しマクロファージの賦活化等により細胞内結核菌殺菌を進行させる作用があるなど, サイトカインは結核における防御機構に深く関与している。

一方, サイトカインには炎症および代謝調節作用も存在し, IL-1 $\beta$ , TNF  $\alpha$ , IL-6 はその中心的なサイトカインである<sup>29,46,47)</sup>。in vitro と動物実験とは IL-1, TNF  $\alpha$  は侵襲時に筋肉に作用し筋蛋白を分解し, 生じた分枝鎖アミノ酸(BCAA)を主に筋肉組織などの末梢でエネルギー源に, また, 一部をアミノ基転移の後, 芳香族アミノ酸と共に肝に輸送しエネルギー源にすると共に, 急性期反応蛋白合成に利用する反応を促進する<sup>48-51)</sup>。また, IL-1, TNF  $\alpha$  は脂肪組織にも作用する。脂肪組織の血管壁に存在する lipoprotein lipase は血中 triglyceride の分解を促進し生成した脂肪酸を脂肪細胞に取り込む際に

必要な酵素であるが、IL-1, TNF  $\alpha$  はこの酵素の作用を阻害して、脂肪細胞への脂肪の移行を阻害する。TNF  $\alpha$  は脂肪細胞内の脂肪分解作用を持つホルモン感受性 lipase の活性を増加させる。この作用は脂肪細胞から脂肪がエネルギー源として利用される反応を促進する。更に TNF  $\alpha$  には細胞内の脂肪酸合成酵素活性を低下させる作用も存在する<sup>35)</sup>。以上のような IL-1, TNF  $\alpha$  の脂肪細胞に対する作用は脂肪細胞内の貯蔵脂肪が減少する方向へ反応を進める。これらの蛋白、脂肪代謝における IL-1, TNF  $\alpha$  の作用は一部はホルモンを介するが<sup>52,53)</sup> 生体においては異化反応を亢進させる作用である。またこれらのサイトカインには同時にエネルギー消費量を増大させる作用も存在する<sup>54,55)</sup>。これに対して IL-6 は IL-1, TNF  $\alpha$  のように筋肉組織や脂肪組織に対する直接作用はないが、これらのサイトカインと協調して、生成したアミノ酸やエネルギーを利用し肝での急性期反応蛋白合成を進める<sup>56)</sup>。

今回、患者群全体では IL-1 $\beta$ , TNF  $\alpha$ , IL-6 産生能は対照群に比し有意の高値を示した。肺結核患者で IL-1 産生能が高値であるという結果は Fujiwara ら<sup>57)</sup> の結果と一致するが、患者群の栄養状態が対照群に比し低値をとっていることと併せて考えるとこれらのサイトカイン産生能と栄養状態との間に何らかの関係が存在する可能性が推測された。そこで栄養状態とサイトカイン産生能との相関を検討したところ、中等度の栄養障害の存在する患者群のサイトカイン産生能はそれより高度の栄養障害、あるいは軽度の栄養障害を有する患者群に比して高値を示す傾向にあることを見いだした。極度の栄養障害の存在する肺結核患者は重症で予後も不良のことが多いこと<sup>10)</sup> から患者群を高度栄養障害群と中等度以下の栄養障害群の2群に分けて検討した。栄養障害が中等度以下の患者群では IL-1 $\beta$ , TNF  $\alpha$ , IL-6 産生能は RBP を除くすべての生化学的栄養指標とすべての身体計測値とは有意の負の相関を認めた。肺結核という慢性感染症においてサイトカイン産生能が高いことはサイトカインの感染防御作用を考えると合目的であるが<sup>5,49-45)</sup>、同時に IL-1, TNF  $\alpha$  の過剰産生が肺結核患者の栄養障害“やせ”を惹起するという生体にとって不利な作用をもたらす可能性を示唆しており、in vitro、動物実験で示された IL-1, TNF  $\alpha$  の筋肉、脂肪組織での異化亢進作用<sup>48,50,51)</sup>、エネルギー消費量増大作用<sup>54,55)</sup> が肺結核患者でも生じていることを今回の検討で著者は新しく実証した。IL-6 が IL-1 $\beta$ , TNF  $\alpha$  と同様に栄養障害の程度と負の相関を示したことは、IL-6 の筋肉や脂肪組織に対する直接的作用は現在のところ証明されていないが、アミノ酸、脂肪代

謝において IL-6 は IL-1, TNF  $\alpha$  と同様な作用を持っている可能性を示しており今後の検討課題と考えられた。

低栄養状態ではリンパ球数減少<sup>58)</sup>、T cell 機能低下<sup>59-61)</sup> など免疫能、特に細胞性免疫能が影響をうける。今回の検討では高度栄養障害の存在する患者群のサイトカイン産生能は中等度以下栄養障害群、更に対照群よりも低値を示している。このような高度栄養障害患者では“やせ”が著明で、筋肉、脂肪は極度に減少しており、これらを分解しエネルギーを産生することがもはや困難になった状態に陥っているとも考えられ、他の疾患による高度の栄養障害状態でのサイトカイン産生能低下と同様に<sup>62,63)</sup> 肺結核患者でもこのようなエネルギー枯渇状態の長期持続が単球によるサイトカイン産生能の低下につながる可能性がある。こうした高度の栄養障害によって引き起こされるサイトカイン産生能低下は T cell 機能低下<sup>59-61)</sup>、NK 細胞活性低下<sup>64)</sup> と相まって、細胞性、液性免疫能に重大な影響を与えることになり得る。

Takashima ら<sup>65)</sup> は新鮮肺結核例では単球の TNF  $\alpha$  産生能が健常人に比し高値を示すが、2年以上の経過を持ち、多剤耐性化を来している chronic refractory type ではむしろ低値を示し、TNF  $\alpha$  産生能の低下が結核の難治化と関係していること、更に、この chronic refractory type での TNF  $\alpha$  産生能低下は遺伝的制御によっている可能性があることを報告している。この報告では栄養状態の検討がなく栄養状態との関連は不明であるが、今回の高度の栄養障害の存在する肺結核患者でサイトカイン産生能が低下している結果から、TNF  $\alpha$  産生能が低下し、重症化、難治化している患者ではその産生能低下が遺伝的要素のみによるものではなく、栄養障害による可能性、すなわち高度の栄養障害がサイトカイン産生能低下を介して肺結核を重症化し、更にその予後を不良に到らせている可能性も考慮する必要がある。

当科ではこれまで詳細な栄養評価による各種疾患における栄養障害の存在を報告したが<sup>2,66,67)</sup>、その原因は必ずしも一様ではない。今回の検討では中等度以下の栄養障害が存在する肺結核患者で IL-1 $\beta$ , TNF  $\alpha$ , IL-6 産生能が栄養状態と負の相関を示しており、これらの患者では過剰なサイトカインが栄養障害を引き起こし、また、逆に高度の栄養障害の存在する患者では栄養障害がサイトカイン産生能を低下させているという栄養とサイトカインとの相互関係を示した。これまで肺結核患者でのサイトカインと栄養との関連を検討した報告は存在せず、結核でのサイトカインの栄養、代謝面への作用は明かにされていない。今回の研究は初めて結核におけるサイトカインと栄養との相互関係を明らかにし、これらの患者で

の栄養障害の原因の一端を示し得た新しい知見である。  
また、今回証明した結核患者における栄養、サイトカイン相互関係の存在は将来の重症難治性結核サイトカイン療法時の栄養支持療法必要性の根拠を与えるものであると考える。

## 結 語

活動性肺結核患者 30 例、健常対照 30 例について、既に報告されている栄養パラメータ、血清アルブミン、トランスフェリン、プレアルブミン、レチノール結合蛋白、血漿遊離アミノ酸を測定、また同時に身体計測も施行し栄養評価した。免疫学的指標として今回新たに末梢血単球の IL-1 $\beta$ , TNF  $\alpha$ , IL-6 産生能を測定、両者の関連について検討した。

### 1. 栄養評価

生化学的指標と身体計測値とはすべての値で患者群は対照群に比し有意の低値を示した。

### 2. サイトカイン産生能

(1) 血清アルブミン値が 2.7 g/dl 以上の中等度以下栄養障害患者群ではすべてのサイトカイン産生能が患者群で対照群に比し有意の高値を示した。

(2) 血清アルブミン値が 2.6 g/dl 以下の高度栄養障害患者群ではすべてのサイトカイン産生能が患者群で対照群に比し有意の低値を示した。

### 3. 栄養状態とサイトカイン産生能との相関

中等度以下栄養障害患者群では RBP を除く他の栄養指標すべてと IL-1 $\beta$ , TNF  $\alpha$ , IL-6 産生能が有意の負の相関を示した。

以上の結果から肺結核患者には従来の報告同様、栄養障害が存在し、今回の結果からこの栄養障害は IL-1 $\beta$ , TNF  $\alpha$ , IL-6 の過剰な作用によって惹起されている可能性が明らかになった。また逆に、極度の栄養障害がこれらのサイトカインの産生能を低下させているという可能性を示唆する結果を得て、栄養、サイトカイン間の新たな相互関係が本研究で明らかになったと考えられる。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました成田亘啓教授に深甚なる謝意を捧げるとともに、御校閲、御助言を賜りました第 2 生理学教室榎 泰義教授ならびに第 3 内科学教室辻井 正教授に深謝いたします。さらに直接御指導、御教示いただきました米田尚弘助手に感謝いたします。

本論文の要旨は World Conference on Lung Health (1990 年 5 月、ポストン)、第 66 回日本結核病学会総会

(1991 年 4 月、京都)において発表した。

## 文 献

- 1) 前川純子, 三上理一郎, 吉川雅則, 坂口泰弘, 三笠桂一, 米田尚弘, 成田亘啓: 活動性肺結核患者の栄養評価, 結核 61: 379-384, 1986.
- 2) 露口泉夫: 人の結核症の免疫. 結核 65: 591-601, 1990.
- 3) 徳永 徹: 結核の免疫学. 結核 64: 121-133, 1989.
- 4) 吉川雅則: 肺結核患者における栄養・免疫学的研究. 奈良医学雑誌 38: 817-832, 1987.
- 5) Denis, M., Gregg, E. D. and Handirian, G. E.: Cytokine modulation of mycobacterium tuberculosis growth in human macrophage. Int. J. Immunopharm. 7: 721-727, 1990.
- 6) Kurlander, R. J., Hoffman, M., Krats, S. S. and Gates, J.: Comparison of the effects of IL-1 alpha and TNF alpha on phagocyte accumulation and murine antibacterial immunity. Cell Immunol. 123/1, 9-22, 1989.
- 7) Kirk, C., and Klasing, : Nutritional aspects of leukocytic cytokines. J Nutr. 118: 1436-1446, 1988.
- 8) Tanaka, K., Ishikawa, E., Ohmoto, Y. and Hirai, Y.: Sandwich enzyme immunoassay for human interleukin-1 $\alpha$  produced in vitro by peripheral blood mononuclear cells. Clinica Chimica Acta 170: 97-104, 1987.
- 9) Ferrua, B., Becker, P. and Schaffar, L.: Detection of human IL-1  $\alpha$  and IL-1 $\beta$  at the subpicomolar level by colorimetric sandwich enzyme immunoassay. J. Immunol. Method 114: 41-48, 1988.
- 10) Gaffney, E. W., Chu, C. W., Lingenfelter, S. E., Lisi, P. J. and Koch, G. A.: Enzyme linked immunoassay with monoclonal antibody for human interleukin-1 $\beta$ . Biotechniques 5: 652-657, 1987.
- 11) 松木 駿: 肥満の判定基準. 日本医師会雑誌 68: 916-919, 1972.
- 12) 金 昌男, 岡田 正, 井村賢治, 山崎芳郎, 北爪博文, 山本賢司, 福岡正英, 土居信吾, 井上淑雄, 川島康生: 臨床栄養の進歩, 一身体計測. 医学のあゆみ 120: 387-395, 1982.
- 13) Blackburn, G. L., Bistrian, B. R. and Maini, B.

- S. : Nutritional and metabolic assessment of the hospitalized patients. *J. Parent, Ent. Nutr.* **1**: 11-22, 1977.
- 14) **Bistrian, B. R., Blackburn, G. L. and Hallowell, E.** : Protein status of general surgical patients. *JAMA* **230**: 858-860, 1974.
- 15) **Bistrian, B. R., Blackburn, G. L. and Vitaie, J.** : Prevalence of malnutrition in general medical patients. *JAMA* **235**: 1567-1570, 1976.
- 16) 米田尚弘 : 肺結核での栄養障害と細胞性免疫. 結核 **64**: 633-640, 1989.
- 17) **Edwards, L. B., Livesay, V. T., Rockville, F. A. and Palmer, C. E.** : Height, weight, tuberculous infection and tuberculus disease. *Arch. Environ. Health* **22**: 106-112, 1971.
- 18) **Nakamura, K.** : Relationship between body build and development of pulmonary tube rculosis. 日本公衆衛生雑誌 **24**: 383-380, 1977.
- 19) 三上理一郎, 米田三平, 石橋純子, 石田一郎 : 結核免疫学の諸問題—結核発病の要因, 奈良県新登録患者調査から. 結核 **56**: 547-551, 1981.
- 20) **Whitehead, R. G. and Dean, R. F. A.** : Serum amino acids in kwashiorkor. I. Relationship to clinical condition. *Am. J. Clin. Nutr.* **14**: 313-379, 1964.
- 21) **Fischer, J. E., Yoshimura, N., Aguirre, A., James, J. Hz., Cummings, M. G., Abel, R. M. and Deindoerfer, F.** : Plasma amino acids in patient with hapatic encephalopathy: Effect of amino acid infusions. *Am. J. Surg.* **127**: 40-47, 1974.
- 22) **Fischer, J. E., Rosen, H. M., Ebeid, A. M., James, J. H., Keave, J. M. and Soeters, P. B.** : The effect of normalization of plasma amino acids on hepatic encephalopathy. *Surgery* **80**: 70-91, 1976.
- 23) 武藤泰敏, 吉田 貴, 山藤正広 : 慢性肝不全の栄養治療—分岐鎖アミノ酸補充療法をめぐる. 日医新報. **3101**: 3-9, 1983.
- 24) **Freund, H. R., Ryan, J. A. and Fischer, J. E.** : Amino acid derangements in patients with sepsis. *Ann. Surg.* **188**: 423-430, 1978.
- 25) 瀬戸律治 : 外科侵襲に伴う窒素代謝の変動に関する臨床的実験研究. 日外会誌. **70**: 380-404, 1969.
- 26) **Dale, G., Young, G. and Latner, A. L.** : The effect of surgical operation on venous plasma free amino acids. *Surgery* **81**: 295-301, 1977.
- 27) 市原 明 : 分岐鎖アミノ酸の生化学. 外科と代謝・栄養 **22**: 281-288, 1988.
- 28) 大屋敷啓司 : 高濃度分岐鎖アミノ酸製剤の術後栄養効果に関する実験的研究. 外科と代謝・栄養 **21**: 86-98, 1987.
- 29) **Wannemacher, R. W.** : Key role of various individual amino acids in host response to infection. *Am. J. Clin. Nutr.* **30**: 1269-1280, 1977.
- 30) **Oppenheim, J. J., Kovacs, E. J., Matsushima, K. and Durum, S. K.** : There is more than one interleukin-1. *Immunol. Today* **7**: 45-56, 1986.
- 31) **Spolsky, R., River, C., Yamamoto, G., Plotsky, P. and Vale, W.** : Interleukin-1 stimulates the secretion of hypothalamic corticotropin-releasing factor. *Science* **238**: 522-524, 1987.
- 32) **Smith, R. J., Speziale, S. C. and Bowman, B. J.** : Properties of interleukin-1 as a complete secretagogue for human neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **130**: 1233-1241, 1985.
- 33) **Carswell, E. A., Old, L. J., Kassel, R. L., Green, S., Fiore, N. and Williamson, B.** : Anendotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**: 3666-3670, 1975.
- 34) **Beutler, B., Greenwald, D. and Hulmes, J. D.** : Identity of tumor necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. *Nature* **316**: 552-554, 1985.
- 35) **Ruggiero, V. and Baglioni, C.** : Synergistic anti-proliferative activity of interleukin-1 and tumor necrosis factor. *J. Immunol.* **138**: 661-663, 1987.
- 36) 川上正舒 : TNF(カケクチン)と脂肪酸代謝. *Med. Immunol.* **14**: 187-190, 1987.
- 37) **Geiger, T., Andus, J. and Klapproth, J.** : Induction for rat acute-phase proteins by interleukin-6 in vivo. *Eur. J. Immunol.* **18**: 717-720, 1988.
- 38) **Parant, M. A., Parant, F. J. and Chedid, L. A.** : Enhancement of resistance to infections by endotoxin-induced serum factor from *Mycobacterium bovis* BCG-infected mice. *Infect. Immunol.* **28**: 654-659, 1980.
- 39) **Houssian, F. A., Bukasa, K. and Sindic, C. J. M.** : Elevated levels of the 26k human

- hybridoma growth factor(interleukin 6) in cerebrospinal fluid of patients with acute infection of the central nervous system. Clin. Exp. Immunol. **71** : 320-323, 1988.
- 40) 吉田 彪 : 結核における肉芽腫病変発生の機序. 結核 **61** : 611-619, 1986.
- 41) Montreewasuwat, N., Curtis, J. and Turk, J. L. : Interleukin-1 and prostaglandin production by cells of the mononuclear phagocyte system isolated from mycobacterium granuloma. Cellular Immunol. **104** : 12-23, 1987.
- 42) Kdndler, V., Sappino, A. P. and Grau, G. E. : The inducing role of tumor necrosis factor in the developmont of bacterial granulomas during BCG infection. Cell **56** : 731-740, 1989.
- 43) Flesch, I. E. A. and Kaufmann, S. H. E. : Activation tuberculostatic macrophage functions by gamma interferon, interleukin-4, and turor necrosis factor. Infect. Immunol. **8** : 2675-2677, 1990.
- 44) Bermudez, L. E. and Young, L. S. : Tumor necrosis factor, alone or in combination with IL-2, but not INF- $\gamma$  is association with macrophage killing of Mycobacterium avium comklex. J. Immunol. **140** : 3006-3013, 1989.
- 45) Denis, M. : Killing of Mycobacterium tuberculosis within human monocyte : activation by cytokines and calcitriol. Clin exp. Immunol. **84** : 200-206, 1991.
- 46) Moldawer, L. L. and Lowry, S. F. : CA-CHECTIN : Its impact on metabolic and nutritional status. Ann. Rev. Nutr. **8** : 585-609, 1988.
- 47) 吉崎和幸, 西本憲弘, 田合ひろみ, 大里浩樹 : 急性炎症と IL-6. 臨床免疫 **21** : 1242-1253, 1989.
- 48) Roh, M. S., Moldawer, L. L., Ekman, L. G., Dinarello, C. A., Bistrrian, B. R., Jeevaandam, M. and Brennan, M. F. : Stimulatory effect of interleukin-1 upon hepatic metabolism. Metabolism **35** : 419-424, 1986.
- 49) Pomposelli, J. J., Flores, E. A. and Bistrrian, B. R. : Role of biochemical mediators in clinical nutrition and surgical metabolism. J. Parenteral and Enteral Nutr. **12** : 212-218, 1988.
- 50) Grimble, R. F. : Cytokines : Their relevance to sutrition. Eur. J. Clin. Nutr. **43** : 217-230, 1989.
- 51) Argiles, J. M., Lopez-Soriano, F. J., Wiggins, D. and Williamson, D. H. : Comparative effects of tumor necrosis factor- $\alpha$ (cachectin), interleukin-1- $\beta$  and tumor growth on amino acid metabolism in the rat in vivo. Biochem. J. **261** : 357-362, 1989.
- 52) Woloski, B. M. R. N. J., Smith, E. M., Meyer, W. J., Fuller, G. M. and Blalock, J. E. : Corticotropin-releasing activity of monokines. Science **230** : 1035-1037, 1985.
- 53) Bernton, E. W., Beach, J. E., Holaday, J. W., Smallridge, R. C. and Fein, H. G. : Release of multiple hormones by a direct action of interleukin-1 on pituitary cells. Science **238** : 519-521, 1987.
- 54) Bradley, R. T., Georgieff, M., Jones, C. T., Moldawer, L. L., Dinarello, C. A., Blackburn, G. L. and Bistrrian, B. R. : Changes in energy expenditure and fat metabolism in rats infused with interleukin-1. Eur. J. Clin. Invest. **17** : 504-510, 1987.
- 55) Tredget, E. E., Yu, Y. M., Zhong, S., Bunini, R., Okusawa, S., Gelfand, J. A., Dinarello, C. A., Young, V. R. and Burke, J. F. : Role of interleukin-1 and tumor necrosis factor on energy metabolism in rabbits. Am. J. Physiol. **253** : E760-E768, 1988.
- 56) Geiger, T., Andus, T., Klapproth, J., Hirano, T., Kithimoto, T. and Heinrich, P. C. : Induction for rat acute-phase proteins by interleukin-6 in vivo. Eur. J. Immunol. **18** : 717-721, 1988.
- 57) Fujiwara, H., Kleinhenz, M. E., Wallis, R. S. and Ellner, J. J. : Increased interleukin production and monocyte suppressor cell activity associated with human tuberculosis. Am. Rev. Respir. Dis. **133** : 73-77, 1986.
- 58) Smythe, P. M., Schonland, M. and Breretonstiles, G. G. : Thymolymphatic deficiency and depression of cell-mediated immunity in protein-calorie malnutrition. Lancet **II**:(No. 7731) : 939-943, 1971.
- 59) Chandra, R. K., Gupta, S. and Stng, H. : Inducer and suppressor T cell subsets in protein-energy malnutrition : Analysis by monoclonal antibody. Nutr. Res. **2** : 21-26, 1982.
- 60) Thomas, M. P. : Effect of reduced dietary pro-

- tein intake on regulation of murine in vitro polyclonal T lymphocyte mitogenesis. *Nutr. Res.* **5**: 263-276, 1985.
- 61) **Chandra, R. K.** : Numerical and functional deficiency in T helper cells in proteinenergy malnutrition. *Clin. Exp. Immunol.* **51**: 126-132, 1983.
- 62) **Kauffman, C. A., Jones, P. G. and Kluger, M. J.** : Fever and malnutrition: endogenous pyrogen/interleukin-1 in malnourished patients. *Am. J. Clin. Nutr.* **44**: 449-452, 1986.
- 63) **Keenan, R. A., Moldawer, L. L., Yang, R. D., Kawamura, I., Blackburn, G. L. and Bistrian, B. R.** : An altered response by peripheral leukocytes in critically ill protein-malnourished patients. *J. Lab. Clin. Med.* **100**: 844-857, 1982.
- 64) **Yoneda, T., Mikami, R., Sakaguchi, Y. and Shirai, F.** : The relationship between natural killer cell activity and delayed type hypersensitivity reaction to 2,4-dinitrochlorobenzene in the spectrum of chronic intractable pulmonary tuberculosis. *Tubercle* **68**: 59-64, 1987.
- 65) **Takashima, T., Ueta, C., Tsuyuguchi, I. and Kishimoto, S.** : Production of tumor necrosis factor alpha by monocytes from patients with pulmonary tuberculosis. *Infect and Immunity* **58**: 3286-3292, 1990.
- 66) 江川信一：肺癌治療における栄養・免疫状態の検討。奈良医学雑誌 **39**: 624-641, 1988.
- 67) 米田尚弘, 吉川雅則, 塚口勝彦, 江川信一, 森川暁, 春日宏友, 成田亘啓, 榎 泰義, 三上理一郎：慢性肺気腫症の臨床栄養評価—栄養障害と呼吸機能・呼吸筋力の密接な関連性。日胸疾会誌. **28**(3): 465-472, 1990.